DOI:10.11931/guihaia.gxzw202310038

木薯糖转运蛋白基因 *MeSWEET*17*b* 的克隆及表达分析

薛晶晶[1,2]，韦卓文[1]，罗秀芹[1]，安飞飞[1,2*]
（1. 中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所/农业农村部木薯种质资源保护与利用重点实验室，海口 571101；2.中国热带农业科学院三亚研究院，海南 三亚 572025）

摘　要：木薯 (*Manihot esculenta*) 是热带亚热带地区重要的粮食作物。糖转运蛋白 SWEETs 能够促进糖在细胞间的流动，在植物生长发育过程中起着重要作用。为了明确 SWEET 家族基因在木薯生长发育过程中的功能，该研究以木薯 KU50 为实验材料，采用基因克隆、生物信息学分析、亚细胞定位、体外酵母检测及 RT-qPCR 等方法研究木薯 *MeSWEET17b* 的基因特性。结果表明: (1) *MeSWEET*17*b* 基因开放阅读框为 726 bp，编码 242 个氨基酸，定位于细胞膜；MeSWEET17b 蛋白与 AtSWEET16、AtSWEET17 亲缘关系最近，含有 7 个跨膜结构域，属于疏水性蛋白。(2) 体外酵母检测表明 MeSWEET17b 主要转运果糖。(3) RT-qPCR 结果表明，*MeSWEET*17*b* 在叶柄和茎杆中表达趋势基本一致，成熟期表达水平最高; 在叶片中表达量较低；在块根膨大期高表达，随着块根生长发育，表达水平急速下降。(4) 对 KU50 水培苗进行高盐（8 g·L^{-1} NaCl）、干旱（100 mmol·L^{-1} 甘露醇）、氧化（10 % H_2O_2）和低温（15 ℃ 24 h，后降至 4 ℃ 24 h）等非生物胁迫处理，RT-qPCR 结果显示，干旱胁迫下，*MeSWEET17b* 在叶片和茎杆中的表达变化差异最大；盐胁迫下，*MeSWEET*17*b* 在叶片和须根中的表达变化最显著；氧化和低温胁迫下，*MeSWEET*17*b* 在须根中的表达呈现飞跃式上升，在叶柄中的表达量随着处理时间的延长呈极显著上升。该研究为进一步研究糖转运蛋白 SWEETs 在木薯中的作用机制提供依据。

关键词：木薯，糖转运蛋白，亚细胞定位，糖转运能力，非生物胁迫

中图分类号：Q943　　　　　　　　　　　　**文献标识码**：A

Cloning and expression analysis of sugar transporter gene *MeSWEET*17*b* in cassava

XUE Jingjing[1,2], WEI Zhuowen[1], LUO Xiuqin[1], AN Feifei[1,2*]
(1. *Tropical Crops Genetic Resources Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences / Key Laboratory of Conservation and Utilization for Cassava Germplasm Resources*, Haikou 571101, China; 2. *Sanya Research Institute of Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences*, Sanya, 572025, China)

Abstract: Cassava (*Manihot esculenta*) is an important food crop in tropical and subtropical regions. Sugar transporter proteins SWEETs facilitate the flow of sugar between cells and play an important role in plant growth and development. In order to clarify the function of SWEET family genes in cassava, KU50 was used as material in this study, and the gene characteristics of *MeSWEET*17*b* were studied by gene cloning, bioinformatics analysis, subcellular localization, *in vitro* yeast detection and RT-qPCR. The results showed as follows: (1) The open reading frame of *MeSWEET*17*b* was 726 bp, encoding 242 amino acids, and located in the plasma membrane. MeSWEET17b had the closest genetic relationship with AtSWEET16 and AtSWEET17, containing 7 transmembrane domains, and belonging to hydrophobic protein. (2) MeSWEET17b mainly transport fructose. (3) The results of RT-qPCR showed that the expression profile of *MeSWEET*17*b* in stem was basically consistent with in petiole, and the expression level was the highest at maturity. The expression level of *MeSWEET*17*b* was relatively low in leaves, and highly expressed in the expansion stage of tuberous root, while decreased rapidly with the growth of tuberous roots. (4) The KU50 seedlings were subjected to abiotic stress such as high salt (8 g·L^{-1} NaCl), drought (100 mmol·L^{-1} mannitol), oxidation (10 % H_2O_2) and cold (15 ℃ for 24 h, then dropped to 4 ℃ for 24 h). RT-qPCR showed that the expression of *MeSWEET*17*b* in leaves and stems had the greatest difference under drought stress. The expression of *MeSWEET*17*b* in leaves and fibrous roots changed most significantly under salt stress. However, under oxidation

---

基金项目：中国热带农业科学院国家热带农业科学中心科技创新团队（CATASCXTD202301）。
第一作者：薛晶晶(1983-)，博士，副研究员，研究方向为木薯糖代谢，（E-mail）xuetao608@163.com。
***通信作者**：安飞飞，博士，副研究员，研究方向为木薯采后腐烂，(E-mail) anfeifei@catas.cn。

and cold stress, the expression of *MeSWEET*17*b* in fibrous root showed a leap increase, while the expression in petiole increased significantly with treatment time. This study provides a reliable reference for further studying the molecular mechanism of sugar transporter *SWEETs* gene in cassava.
Key words: cassava, sugar transporter, subcellular localization, sugar transport capacity, abiotic stress

糖是真核生物和原核生物重要的能量来源。糖转运蛋白 SWEETs 是真核生物和原核生物中主要的转运蛋白，能够促进糖在细胞间的流动。SWEET 基因及其同源物广泛分布于包含细菌和古生菌的几乎所有生命领域 (Chen et al., 2015)。所有真核生物的 SWEETs 都是由七个预测的跨膜 (7TM) 结构域组成，其中 3TM 重复序列由连接螺旋连接起来。整个结构以 3-1-3 的拓扑结构排列在细胞膜上 (Chen et al., 2010)。植物中，SWEETs 主要定位于细胞质膜上，存在于不同细胞器官，如：内质网、高尔基体和液泡 (Feng et al., 2015)。定位于质膜上的 SWEET 转运蛋白可以将胞液中的糖转运到质外体，行使不同的功能，如花蜜分泌 (Lin et al., 2014)、质外体韧皮部装载 (Chen et al., 2015)、种子灌浆 (Guan et al., 2008)、花粉营养 (Sun et al., 2013)、病原体感染 (Chen et al., 2010)以及非生物胁迫 (Wu et al., 2023) 等。

木薯（*Manihot esculenta*）块根富含淀粉，是世界三大薯类作物之一，也是热带亚热带地区重要的粮食作物，全世界约有 10 亿人以木薯作为主要食粮（Cai et al., 2023）。木薯以蔗糖为主要运输物质。木薯光合产物的分配是糖通过韧皮部维管系统从气生叶向地下贮藏根的长距离运输过程。SWEET 蛋白属于 MtN3/saliva gene family，也称为 MtN3/saliva/SWEET，可以转运己糖和蔗糖，并介导糖外流到质外体。木薯 *SWEET* 家族共有 28 个同源基因，根据其转运不同糖的特性，可以分为 4 个亚类。其中对 *MeSWEET*10*a* 的研究最深入，研究显示，地毯黄单胞菌的毒力可以通过转录激活因子 *TAL20* 特异性诱导木薯 *MeSWEET*10*a* 的表达，增加糖的积累并最终导致木薯细菌性枯萎病的蔓延 (Cohn et al., 2014; Chaves et al., 2021)。此外，*MeSWEET*1、*MeSWEET*3*b*、*MeSWEET*15*a*、*MeSWEET*15*b* 及 *MeSWEET*18 也有报道。其中，木薯 *MeSWEET*1 基因定位于细胞膜上，在成熟叶片的表达量最高 (刘秦等, 2017)。木薯 *MeSWEET*3*b* 主要转运半乳糖，黄单胞菌 Xam 能够诱导其表达(朱柏光等，2022)。木薯 *MeSWEET*15*a* 及 *MeSWEET*15*b* 基因可以转运蔗糖、葡萄糖、果糖和甘露糖，VIGS 沉默能够增强木薯对干旱胁迫和盐胁迫的耐受性（Fan et al., 2023）。而木薯 *MeSWEET*18 主要转运果糖，VIGS 沉默会导致其叶片中果糖含量的增加 (薛晶晶等, 2022, 2023)；GWAS 分析发现 *MeSWEET*18 与木薯块根干物质含量紧密相关（Rabbi et al., 2022），主要在木薯块根中发挥作用。前人对木薯糖转运蛋白 SWEET 家族基因的研究多集中在基因克隆，糖转运特性分析及非生物胁迫的表达特性等，其调控木薯块根淀粉含量、干物率的作用机制还未深入研究。前期研究发现，木薯糖转运蛋白 MeSWEET17b 与 MeSWEET18 亲缘关系最近，但其功能尚未报道。因此，本研究以木薯 KU50 为研究材料，通过克隆、亚细胞定位、糖转运特性分析以及非生物胁迫等方法，了解木薯 *MeSWEET*17*b* 的蛋白质性质、糖转运特性以及非生物胁迫下的表达变化。拟探讨与 *MeSWEET*18 亲缘关系最近的 *MeSWEET*17*b* 在木薯中的表达情况，从而为糖转运蛋白 SWEETs 在木薯中的功能研究提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

本研究采用生长于中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所国家木薯种质资源圃的 KU50 种质作为研究材料，分别取 KU50 形成期(植后 4 个月)、膨大期(植后 7 个月)及成熟期(植后 10 个月)叶片、叶柄、茎杆和块根。非生物胁迫主要是将生长 20 d 的 KU50 水培苗，分别放入含有 8 g·L^{-1} NaCl、100 mmol·L^{-1} 甘露醇及 10 % H_2O_2 的溶液中进行盐、干旱和氧化处理，各处理时间分别为 0 h (CK)、12 h、24 h 和 36 h。低温处理则将水培苗直接放入植物光照培养箱采用 15 ℃ 24 h，后降至 4 ℃ 24 h 进行处理。采集的样本立即在液氮中冷冻并储存 -80 ℃冰箱，每个样本重复 3 次。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 提取与 cDNA 合成

总 RNA 的提取参照 RNAprep Pure 多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒(Tiangen)的操作说明进行。cDNA 第一链的合成参照 RevertAid RT 逆转录试剂盒（Thermo）的操作说明进行。

1.2.2 *MeSWEET*17*b* 基因全长 cDNA 扩增

以 Phytozome12.0 中 *Manihot esculenta* v7.1 数据库的 *MeSWEET17b* 序列设计引物(表 1)，以 KU50 的 cDNA 为模板进行序列克隆。全长 cDNA 的扩增体系含 PrimeSTAR Max Premix(2×) 25 μL、*MeSWEET*17*b*-F (10 $\mu mol \cdot L^{-1}$) 2.5 μL、*MeSWEET*17*b*-R (10 $\mu mol \cdot L^{-1}$) 2.5 μL、cDNA 模板 0.5 μL、灭菌水补足 50 μL。扩增程序为：95 ℃预变性 5 min; 95 ℃ 30 s、56 ℃ 30 s、72 ℃ 1 min、共 34 个循环；72 ℃延伸 10 min。0.8%的琼脂糖凝胶电泳分离 PCR 扩增产物，回收纯化目的条带，克隆至 pEASY-Blunt Simple Cloning Vector 载体上测序。

1.2.3 生物信息学分析

利用 NCBI 网站 ORF Finder 软件对获得的 KU50 cDNA 序列进行开放阅读框(ORF)预测，同时翻译成蛋白序列。ProtParam 软件分析该蛋白的分子量与等电点；NCBI 在线软件 CDD 分析蛋白的保守结构域；TMHMM Server v.2.0 在线软件进行跨膜结构域分析；ProtScale 在线软件预测该氨基酸序列的疏水性 / 亲水性；SOPMA SECONDARY STRUCTURE PREDICTION METHOD 在线软件预测蛋白的二级结构。从拟南芥 TAIR 数据库下载所有 SWEET 的蛋白序列，利用 MEGA5.0 软件，选择 neighbour-joining (NJ) 模型，并进行 1 000 次 bootstrap 统计学检验，构建包括 MeSWEET17b 蛋白序列在内的木薯和拟南芥 SWEET 蛋白的系统进化树。利用 DNAMAN 软件比对 MeSWEET17b 和 AtSWEET16、 AtSWEET17 的序列同源性。

1.2.4 MeSWEET17b 亚细胞定位

使用含有pCAMBIA1302表达载体同源序列的引物（表1）扩增*MeSWEET*17*b*不含终止密码子的CDS序列，利用重组克隆试剂盒ClonExpress II One Step Cloning (Vazyme) 将 *MeSWEET*17*b* 亚克隆至 pCAMBIA1302-GFP 空载体上，构建亚细胞定位载体 35S:: MeSWEET17b-GFP，35S:: GFP 作为对照。将重组质粒转化农杆菌感受态细胞 GV3101，挑取单菌落用YEP液体培养基（含50 $\mu g \cdot mL^{-1}$ Kana，25 $\mu g \cdot mL^{-1}$ Rif），28 ℃ 220 $r \cdot min^{-1}$进行活化，后扩大培养直至菌液OD_{600}在0.8~1.0间。将菌液置于离心机中，5 000 $r \cdot min^{-1}$离心10 min后收集菌体沉淀。用15 mL侵染液（10 $mmol \cdot L^{-1}$ $MgCl_2$，10 $mmol \cdot L^{-1}$ MES pH 5.8，100 $\mu mol \cdot L^{-1}$ AS）洗涤菌体，重复洗涤一次。最后用侵染液重悬菌体，调OD_{600}约0.8，黑暗静置活化2~3 h，然后侵染烟草叶片，25 ℃黑暗培养48~72 h，通过荧光共聚焦激光扫描显微镜观察，拍照。

1.2.5 实时荧光定量 PCR 分析

采用 Thermo 公司的 CFX 实时荧光定量 PCR 系统，实验操作按仪器使用说明书进行。将 cDNA 稀释 10 倍作为 RT-qPCR 分析的模板。10 μL 反应体系中，包含 1 μL 模板、5 μL 2×SYBR Green qPCR Mix、0.8 μL10 $\mu mol \cdot L^{-1}$ qPCR-*MeSWEET*17*b* 引物 、灭菌水补足 10 μL。PCR 反应程序：95 ℃预变性 30 s，95 ℃ 10 s、60 ℃ 20 s 共 40 个循环，循环完成后进行产物溶解曲线分析。以 *MeActin* 作为内参基因，以 $2^{-\triangle\triangle ct}$ 算法进行基因的相对定量表达分析。

1.2.6 MeSWEET17b 的糖转运特性分析

EBY.VW4000 酵母是一种己糖转运功能缺陷型酵母突变体，此菌株无法在己糖为唯一碳源的尿嘧啶(ura)缺陷型选择培养基 SD-ura 平板上生长，可以在麦芽糖为唯一碳源的选择培养基 SD-ura 平板上恢复生长。将 *MeSWEET*17*b* 的 CDS 序列构建到酵母功能穿梭载体 pDR196（表 1）上，使用 Yeastmaker™ Yeast Transformation System 2 kit 酵母转化试剂盒(Clontech)的聚乙二醇/醋酸锂高效酵母转化法将重组后的 *MeSWEET*17*b*-pDR196 质粒转化到 EBY.VW4000 酵母菌中。在选择培养基 SD-ura + 2 %麦芽糖平板上划线培养，倒置于 30 ℃培养箱中培养 3~5 d。挑单菌落放入 SD-ura + 2 %麦芽糖液体培养基中过夜摇菌 (30 ℃，220 $r \cdot min^{-1}$)。待 OD_{600} 达到 1 左右时，停止摇菌。取 1 mL 菌液加入 1.5 mL 无菌离心管中，室温下，高速离心 15 s，收集菌体，弃上清。加入 1 mL 无菌超纯水，重悬菌体，再次高速离心 15 s，收集菌体，弃上清。如此清洗重悬 2-3 次菌体，尽量降低液体培养基的影响。取 4 μL 菌液为 X 1 倍，依次稀释 X 10 倍、X 100 倍、X 1 000 倍和 X 10 000 倍，均匀点涂到施加不同唯一碳源的 SD-ura 选择培养基上 (SD-ura + 2 %麦芽糖、SD-ura + 2 %葡萄糖、SD-ura + 2 %果糖、SD-ura + 2 %蔗糖)，倒置 30 ℃培养箱培养 3~5 d，观察生长情况。

1.2.7 分析方法及数据处理

采用 Excle 分析数据，GraphPad Prifm 5.0 软件作图以及 Dunnett 's 检验。

表 1 引物序列

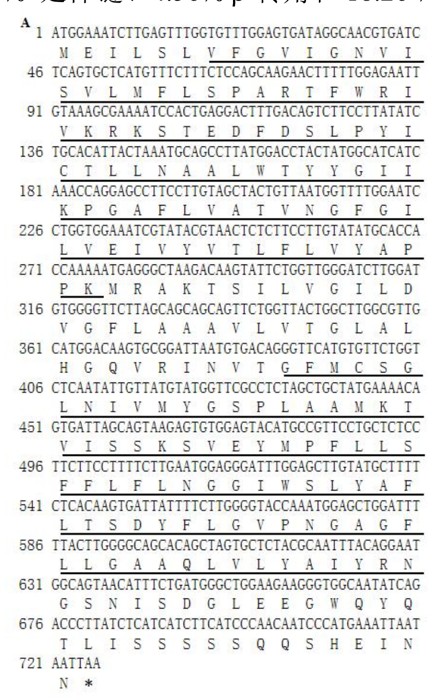
Table 1 Primer Sequence

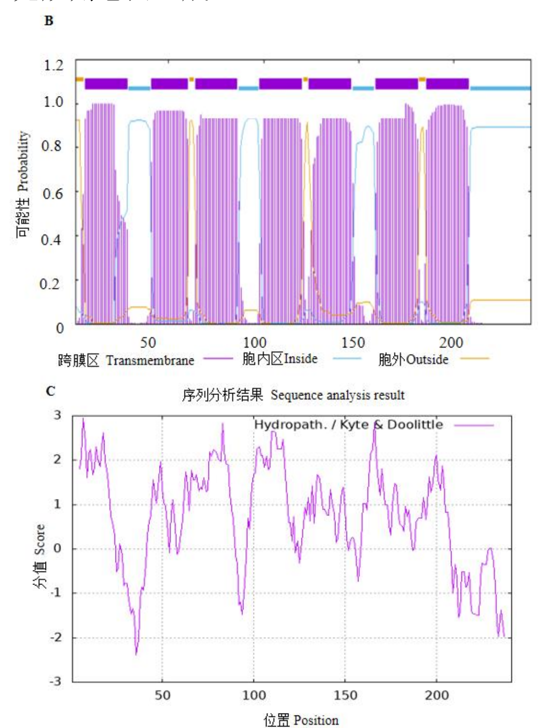
名称 Name	序列 Sequence
MeActin-F	5'-TGATGAGTCTGGTCCATCCA-3'
MeActin-R	5'-CCTCCTACGACCCAATCTCA-3'
MeSWEET17b-F	5'-TTGGGCAGGAAAGAAAATCAAT-3'
MeSWEET17b-R	5'-GTTCTCTTCAATAACGTCTTCC-3'
MeSWEET17b-gfp-F	5'-GAGAACACGGGGGACT ATGGAAATCTTGAGTTTG -3'
MeSWEET17b-gfp-R	5'- AAAGTTCTTCTCCTTT TTAATTATTAATTTCATG -3'
MeSWEET17b-qPCR-F	5'- ACTCTCTTCCTTGTATATGCACCAC-3'
MeSWEET17b-qPCR-R	5'- CTAGAGGCGAACCATACATAACAAT-3'
MeSWEET17b-pdr196-F	5'-ATATACCCCAGCCTCGATGGAAATCTTGAGTTTG-3'
MeSWEET17b-pdr196-R	5'-CGATAAGCTTGATATC TTAATTATTAATTTCATG

2 结果与分析

2.1 *MeSWEET*17*b* 基因全长 CDS 克隆及蛋白质结构特性分析

通过 RT-PCR 扩增及测序，获得 *MeSWEET*17*b* 基因编码框序列 726 bp，编码 242 个氨基酸 (图 1: A) ，蛋白分子质量为 26.32 kDa，理论等电点为 7.72，不稳定系数为 40.54，属于不稳定类蛋白。通过 NCBI 在线软件 CDD 分析发现，该蛋白 N 端含有 MtN3_slv 蛋白结构域，含有 2 个 PQ-loop superfamily。TMHMM Server v.2.0 在线软件预测显示，该蛋白含有 7 个跨膜结构域，是典型的膜蛋白(图 1: B)；ProtScale 预测表明，*MeSWEET17b* 蛋白属于疏水性蛋白 (图 1: C)；SOPMA 分析显示，MeSWEET17b 蛋白二级结构由 49.79% α-螺旋、27.39% 延伸链、4.56% β-转角和 18.26 % 无规则卷曲组成。





A. 核苷酸序列和推导的氨基酸序列(*表示终止密码子，下划线表示保守结构域 PQ-loop superfamily)；**B**. 跨膜结构域预测；**C**. 蛋白亲水性/疏水性预测。

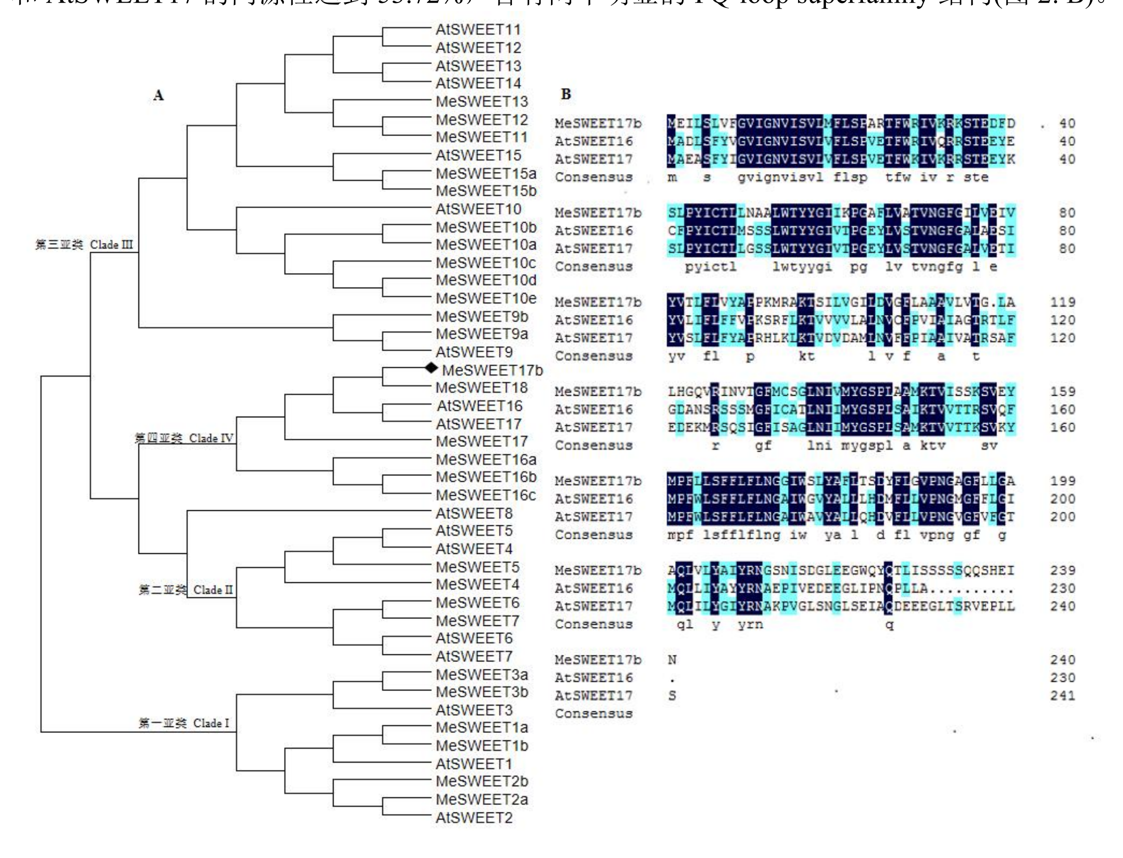
A. Nucleotide and derived amino acid sequences (* represents stop codon, underline represents conserved domains PQ-loop superfamily); **B**. Prediction of transmembrane domains; **C**. Protein hydrophilic/hydrophobic prediction.

图 1 *MeSWEET17b* 的核苷酸序列和蛋白质结构特性

Fig.1 Nucleotide sequence and protein structure of *MeSWEET*17*b*

2.2 MeSWEET17b 的系统进化树分析

对木薯糖转运蛋白 SWEETs 和拟南芥 SWEET 蛋白进行系统进化树分析，发现 MeSWEET17b 与拟南芥 AtSWEET16 和 AtSWEET17 位于同一进化枝上，属于 Clade IV（图 2: A）。采用 DNAMAN 软件对 MeSWEET17b、AtSWEET16 和 AtSWEET17 氨基酸序列进行比对，结果显示，MeSWEET17b 和 AtSWEET16 的同源性达到 51.24%，MeSWEET17b 和 AtSWEET17 的同源性达到 53.72%，含有两个明显的 PQ-loop superfamily 结构(图 2: B)。



A. 系统进化树；**B**. 蛋白质序列比对。

A. Phylogenetic tree; **B**. Protein sequence alignment.

图 2 MeSWEET17b 的系统进化树及蛋白质序列比对

Fig.2 Phylogenetic analysis and protein sequence alignment of MeSWEET17b

2.3 MeSWEET17b 的亚细胞定位

将 35S:: GFP 和 35S::MeSWEET17b-GFP 重组质粒转化农杆菌感受态细胞 GV3101，并侵染烟草叶片，在荧光共聚焦显微镜下观察其在烟草中的表达情况，结果显示, 35S:: GFP 在细胞膜和细胞核中均能观察到荧光信号，而 35S::MeSWEET17b-GFP 只在细胞膜上存在荧光信号，推测 MeSWEET17b 定位于细胞膜（图 3）。

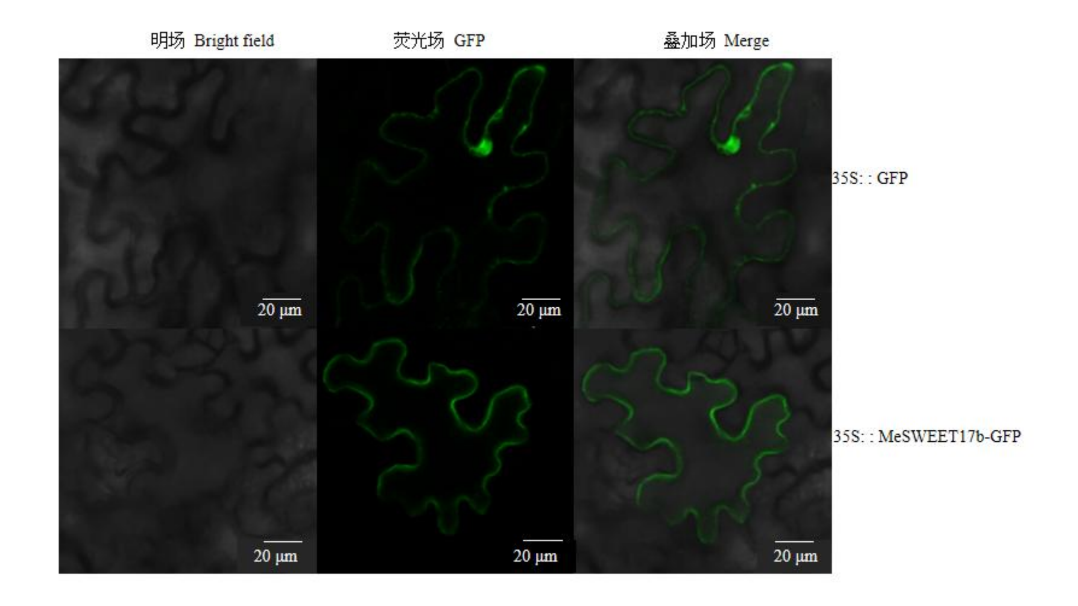


图 3 MeSWEET17b 的亚细胞定位

Fig.3 Subcellular localization of MeSWEET17b

2.4 MeSWEET17b 的糖转运特性

为了验证 MeSWEET17b 的糖转运特性，将 pDR196 和重组后的 MeSWEET17b-pDR196 质粒转化至以麦芽糖作为唯一碳源的已糖转运缺陷型酵母 EBY.VW4000 中。将含有 pDR196 和 MeSWEET17b-pDR196 的转化酵母按照 1、10^{-1}、10^{-2}、10^{-3}、10^{-4} 稀释，然后点涂于含有 2%麦芽糖（对照）、2%葡萄糖、2%果糖及 2%蔗糖等不同碳源的选择培养基 SD-ura 平板上，30 ℃，倒置培养 3~5 d，观察生长情况。结果发现，pDR196 和 MeSWEET17b-pDR196 均能在 2%麦芽糖为唯一碳源的 SD-ura 平板上生长；同时，MeSWEET17b-pDR196 也能在 2%果糖为唯一碳源的 SD-ura 平板上生长，推测 MeSWEET17b 主要转运果糖。

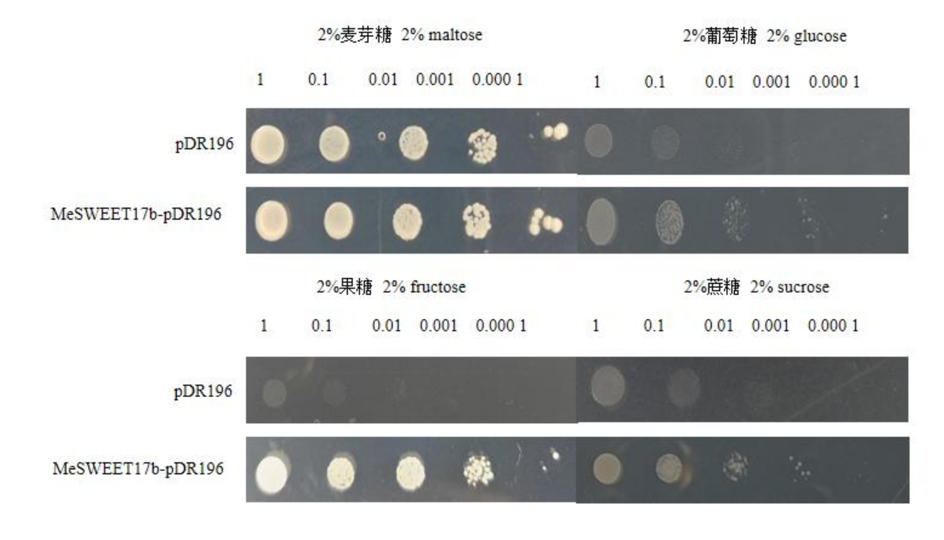


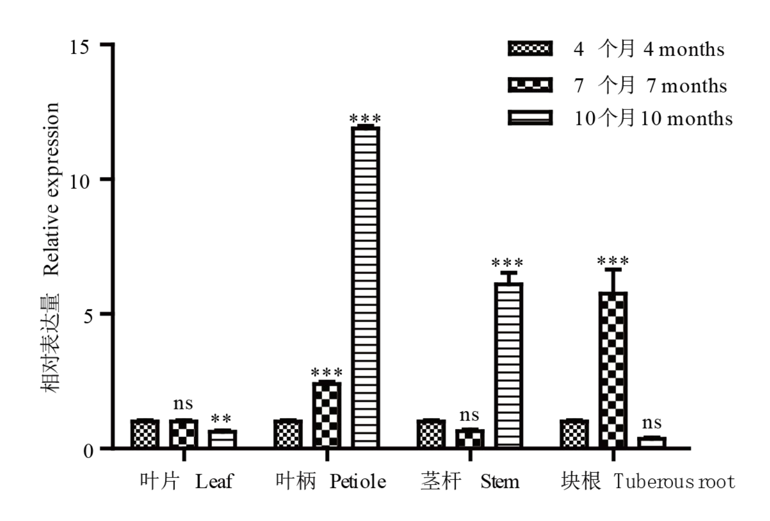
图 4 MeSWEET17b 的糖转运特性

Fig.4 Sugar transport properties of MeSWEET17b

2.5 *MeSWEET*17*b* 在木薯不同器官不同发育时期的表达

分别取 KU50 形成期、膨大期及成熟期叶片、叶柄、茎杆和块根材料，提取总 RNA 后，进行 RT-qPCR 分析，结果表明：*MeSWEET*17*b* 在木薯叶片中的表达较低，至成熟期降到最低；在叶柄中的表达随着木薯的生长持续上升，在成熟期达到最大；*MeSWEET*17*b* 在膨大

期和形成期的茎杆表达无差异，成熟期呈显著上升；*MeSWEET*17*b* 在木薯块根膨大期表达量最高，随着块根生长，表达量低于形成期。



ns 表示无差异（*P*>0.05），*表示有差异（*P*＜0.05），**表示差异显著（*P*＜0.01），***表示差异极显著（*P*＜0.001）]。下同。

ns indicates no differences (*P*>0.05), * indicates differences（*P*＜0.05）** indicates significant differences (*P*＜0.01), *** indicates extremely significant differences (*P*＜0.001). The same below.

图 5 *MeSWEET*17*b* 在木薯不同器官不同发育时期的表达分析

Fig.5 Expression analysis of *MeSWEET*17*b* in different organs of cassava at different developmental stages

2.6 *MeSWEET*17*b* 在非生物胁迫下的表达分析

将 KU50 茎杆水培培养 20 d 后，进行干旱、盐、氧化以及低温胁迫，干旱、盐和氧化胁迫处理时间为 0、12、24、36 h，低温胁迫采用 15 ℃ 24 h，后降至 4 ℃ 24 h 的处理方式。采集每个时间点的叶片、叶柄、茎杆和须根进行 RT-qPCR 表达分析。RT-qPCR 分析结果显示，干旱胁迫和盐胁迫下，随着处理时间的延长，*MeSWEET*17*b* 的表达呈先上升后下降的趋势；当干旱胁迫 24 h 时，*MeSWEET*17*b* 在叶片、茎杆和须根的表达水平达到最大，与 0 h 相比，叶片和茎杆在处理 24 h 时表达水平分别提高了 11.17 和 20.95 倍。盐胁迫 12 h 时，*MeSWEET*17*b* 在叶片和茎杆中的表达较对照分别上升了 42.46 和 3.62 倍。氧化胁迫下，*MeSWEET*17*b* 在 KU50 须根中的表达水平最高，24 h 时较对照上升了 1 876 倍，且叶片和须根中的表达趋势均先上升后下降，而叶柄和茎杆的表达则先下调再上升，至 36 h 达到最大值。低温（15 ℃）处理 24 h，*MeSWEET*17*b* 在叶柄、茎杆和根的表达呈上升趋势，随着低温（4 ℃）处理 24 h，叶柄和须根中的表达进一步上调；但其在叶片中的表达则先下降再上升。

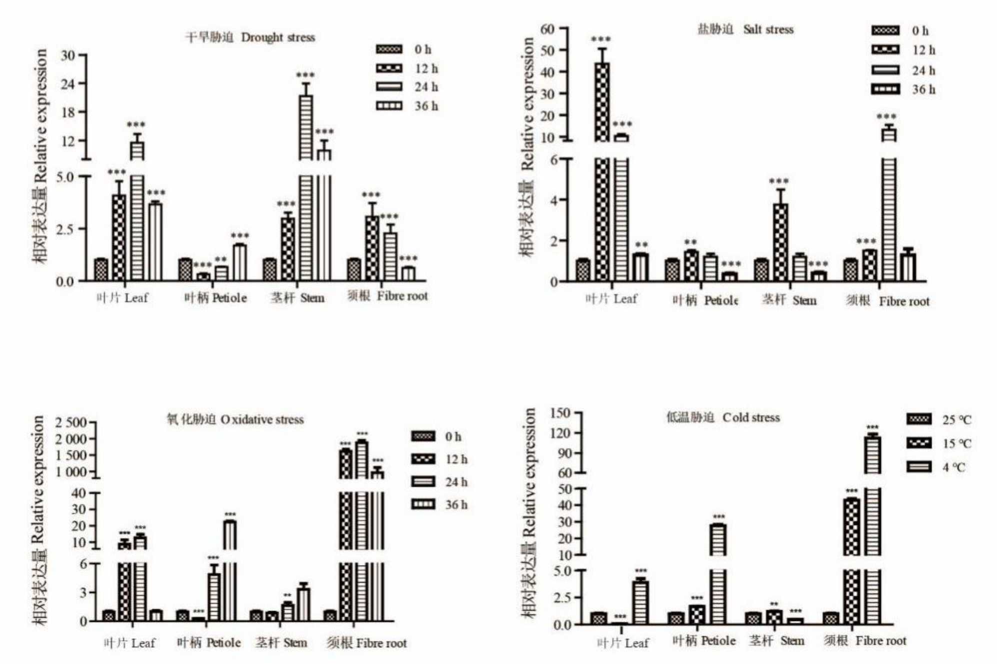


图 6 *MeSWEET*17*b* 在木薯不同器官非生物胁迫下的表达分析

Fig.6 Expression analysis of *MeSWEET*17*b* in different organs of cassava under abiotic stress

3 讨论与结论

糖在植物的生理代谢、生长发育等方面具有重要作用。不仅是植物生长和细胞新陈代谢的能量来源，也是细胞的重要信号分子 (Liu et al., 2019)。而糖转运蛋白 SWEET 基因能够调控细胞内外以及器官间的糖含量，影响植物的源库关系 (Guo et al., 2009) 进而协调植物生长发育及环境响应 (Yu et al., 2012)。以木薯 KU50 叶片 cDNA 为模板，扩增 *MeSWEET*17*b* 的 CDS 序列，与 *Manihot esculenta* v7.1 数据库中 AM560 的序列进行比对，结果发现无碱基差异，表明 *MeSWEET*17*b* 在木薯中高度保守。利用 RT-qPCR 分析 *MeSWEET*17*b* 在 KU50 不同发育期的叶片、叶柄、茎杆和块根的表达情况，发现 *MeSWEET*17*b* 在叶柄中高表达，其成熟期的表达量达到最大，在叶片、茎杆和块根中的表达量较低。与木薯栽培种 TME204 不同组织/器官中的转录组结果是一致的 (Wilson et al., 2017)。体外酵母检测发现 MeSWEET17b 主要转运果糖，推测木薯 MeSWEET17b 主要负责将叶柄中聚集的果糖进行外排，在木薯的'流'器官中发挥作用。烟草瞬时表达显示 MeSWEET17b 主要定位于细胞膜，是典型的膜蛋白，与 MeSWEET1(刘秦等，2017)，MeSWEET15a、MeSWEET15b（Fan et al., 2023）的研究结果一致。

系统进化树分析表明，MeSWEET17b 位于 CladeIV，与拟南芥 AtSWEET16 和 AtSWEET17 属于同一进化分支。MeSWEET17b 与木薯 MeSWEET18 亲缘关系最近，氨基酸序列同源性达到 82.79 %。木薯 MeSWEET18 主要转运果糖，VIGS 沉默 *MeSWEET*18 后，其沉默株系叶片的果糖含量增多 (薛晶晶等，2022，2023)。拟南芥 *AtSWEET*17 在叶片的果糖分配上发挥着重要作用且 *AtSWEET*17 沉默株系表现为果糖积累功能紊乱、植株发育不良等（Chardon et al., 2013）。对 MeSWEET17b 的糖转运特性进行分析，发现其主要转运果糖，与 MeSWEET18 和 AtSWEET17 主要影响果糖积累的研究结果一致。

苹果糖转运蛋白基因 *MdSWEET*17 转化番茄后，能够增强番茄对干旱的耐受性，同时积累更多的果糖 (Lu et al., 2019)。过表达拟南芥 *AtSWEET*17 和 *AtSWEET*16 会导致冷胁迫下叶片液泡中果糖积累减少 (Chardon et al., 2013)。定位于液泡膜上的果糖特异性转运蛋白 SWEET17，能够影响干旱条件下拟南芥侧根的生长(Valifard et al., 2021)。茶树 *CsSWEET*16 基因参与糖在液泡膜上的分配，能够影响拟南芥低温胁迫下的耐受性(Wang et al., 2018)。百合 *LoSWEET*14 基因在干旱、低温、盐等非生物胁迫及 ABA 处理下的表达显著增加，*LoSWEET*14 基因过表达烟草株系显著增强了对干旱、低温等非生物胁迫及 ABA 的敏感性，但其与拟南芥 *AtSWEET*10 亲缘关系最近，主要转运蔗糖(Zeng et al., 2022)。对木薯 KU50

水培苗进行盐、干旱、氧化和低温等处理，对处理不同时间的叶片、叶柄、茎杆和须根等器官进行 RT-qPCR 分析，结果发现：非生物胁迫下，*MeSWEET*17*b* 在叶片、叶柄、茎杆和须根等器官的表达水平随着处理时间的延长呈现显著差异；干旱胁迫下，*MeSWEET*17*b* 在叶片和茎杆中的表达变化差异最大；盐胁迫下，*MeSWEET*17*b* 在叶片和须根中的表达变化最显著；氧化和低温胁迫下，*MeSWEET*17*b* 在须根中的表达呈现飞跃式上升，在叶柄中的表达量随着处理时间的延长呈极显著上升。*MeSWEET*17*b* 在叶柄中表达量最高，可能主要作用于叶柄的糖转运。因此，推测木薯 *MeSWEET*17*b* 可能主要在氧化胁迫和低温胁迫下起作用。

在后续研究中，利用木薯原生质体对 *MeSWEET*17*b* 进行亚细胞定位，明确其定位的具体细胞类型。分析 *MeSWEET*17*b* 启动子序列中与非生物胁迫、糖信号等相关的顺式作用元件，构建 pMeSWEET17b::GUS 载体转化木薯，采用组织化学染色法对转基因植株中 GUS 基因的表达情况进行分析。对获得的 *MeSWEET*17*b* 的过表达株系及 Crispr Cas9 基因编辑株系的叶片、叶柄、茎杆及块根的糖含量进行测定，并分析 *MeSWEET*17*b* 以及糖代谢相关基因的表达趋势；同时，选择差异倍数明显的株系进行转录组分析及非生物胁迫研究，筛选调控 *MeSWEET*17*b* 的转录因子，深入研究木薯 *MeSWEET17b* 的基因功能，为糖转运蛋白 SWEET 家族基因在木薯中的功能提供理论依据。

参考文献：

CAI J, XUE JJ, ZHU WL, et al., 2023. Integrated metabolomic and transcriptomic analyses reveals sugar transport and starch accumulation in two specific germplasms of *Manihot esculenta* Crantz [J]. Int J Mol Sci, 24(8): 7236-7249.

CHARDON F, BEDU M, CALENGE F, et al., 2013. Leaf fructose content is controlled by the vacuolar transporter *SWEET*17 in arabidopsis [J]. Curr Biol, 23(8): 697-702.

CHAVES CAZ, RODRÍGUEZ DO, MORA RE, et al., 2021. TAL Effector repertoires of strains of *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis* in commercial cassava crops reveal high diversity at the country scale [J]. Microorganisms, 9(2): 315-340.

CHEN HY, HUH JH, YU YC, et al., 2015. The Arabidopsis vacuolar sugar transporter *SWEET*2 limits carbon sequestration from roots and restricts pythium infection [J]. Plant J, 83 (6): 1046-1058.

CHEN LQ, HOU BH, LALONDE S, et al., 2010. Sugar transporters for intercellular exchange and nutrition of pathogens [J]. Nature, 468 (7323): 527-532.

FAN XW, SUN JL, CAI Z, et al., 2023. *MeSWEET*15*a/b* genes play a role in the resistance of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) to water and salt stress by modulating sugar distribution [J]. Plant Physiol Biochem, 194: 394-405.

FENG L, FROMMER WB, 2015. Structure and function of SemiSWEET and SWEET sugar transporters [J]. Trends Biochem Sci, 40(8): 480-486.

GUAN YF, HUANG XY, ZHU J, et al., 2008. RUPTURED POLLEN GRAIN1, a member of the MtN3/saliva gene family, is crucial for exine pattern formation and cell integrity of microspores in arabidopsis [J]. Plant Physiol, 147(2): 852-863.

LIN W, SOSSO D, CHEN LQ, et al., 2014. Nectar secretion requires sucrose phosphate synthases and the sugar transporter *SWEET*9 [J]. Nature, 508 (7497): 546-561.

LIU HT, LYU WY, TIAN SH, et al., 2019. The sweet family genes in strawberry: identification and expression profiling during fruit development [J]. S Afr J Bot, 125: 176-187.

LIU Q, MA C, FENG SP, et al., 2017. Molecular cloning, subcellular localization and function analysis of a *MeSWEET*1 gene from *Manihot esculenta* [J]. Mol Plant Breed, 15(7): 2502-250. [刘秦，马畅，冯世鹏，等，2017. 木薯 *SWEET*1 基因的分子克隆、亚细胞定位与功能分析 [J]. 分子植物育种，15(7): 2502-2509.]

LU J, SUN MH, MA QJ, et al., 2019. *MdSWEET*17, a sugar transporter in apple, enhances drought tolerance in tomato [J]. J Integr Agric, 18(9): 2041-2051.

RABBI IY, KAYONDO SI, BAUCHET G, et al., 2022. Genome-wide association analysis reveals new insights into the genetic architecture of defensive, agro-morphological and quality-related traits in cassava [J]. Plant Mol Biol, 109 (3): 195-213.

SUN M, HUANG X, YANG J, et al., 2013. Arabidopsis RPG1 is important for primexine deposition and functions redundantly with RPG2 for plant fertility at the late reproductive stage [J]. Plant Reprod, 26(2): 83-91.

VALIFARD M, HIR RL, MÜLLER J, et al., 2021. Vacuolar fructose transporter *SWEET*17 is critical for root development and drought tolerance [J]. Plant Physiol, 187(4): 2716-2730.
WANG L, YAO LN, HAO XY, et al., 2018. Tea plant SWEET transporters: expression profiling, sugar transport, and the involvement of *CsSWEET*16 in modifying cold tolerance in arabidopsis [J]. Plant Mol Biol, 96 (6): 577-592.
WILSON MC, MUTKA AM, HUMMEL AW, et al., 2017. Gene expression atlas for the food security crop cassava [J]. New Phytol, 213 (4): 1632-1641.
WU YT, WANG SS, DU WH, et al., 2023. Sugar transporter *ZmSWEET*1*b* is responsible for assimilate allocation and salt stress response in maize [J]. Funct Integr Genomics, 23(2): 137-147.
XUE JJ, AN FF, LUO XQ, et al., 2022. Study on the function of cassava sugar transporter *Mesweet*18 by VIGS[J]. Curr Biotechnol, 12 (6): 888-893. [薛晶晶，安飞飞，罗秀芹，等，2022. VIGS 技术鉴定木薯糖转运蛋白 *Mesweet*18 的功能研究[J]. 生物技术进展，12(6)：888-893.]
XUE JJ, AN FF, ZHU WL, et al., 2023. Cloning and functional analysis of sugar transporter *MeSWEET*18 in cassava[J]. Chin J Trop Crops, 44 (6): 1083-1090. [薛晶晶，安飞飞，朱文丽，等，2023. 木薯糖转运蛋白 *MeSWEET*18 的克隆与功能分析[J]. 热带作物学报，44(6)：1083-1090.]
YIN X, GUO W, SPIERTZ JH. 2009. A quantitative approach to characterize sink-source relationships during grain filling in contrasting wheat genotypes [J]. Field Crop Res, 114(1): 119-126.
YU Y, HUI Z, LI W, et al., 2012. Genome-wide analysis and environmental response profiling of the fk506-binding protein gene family in maize (*Zea mays* L.) [J]. Gene, 498(2): 212-222.
ZENG Z, LYU T, LYU YM. 2022. *LoSWEET*14, a Sugar transporter in Lily, is regulated by transcription factor loabf2 to participate in the ABA signaling pathway and enhance tolerance to multiple abiotic stresses in tobacco [J]. Int J Mol Sci, 23(23): 15093-15111.
ZHU BG, LI C, ZHANG XJ, et al., 2022. Molecular cloning and function analysis of a *MeSWEET*3*b* gene from *Manihot esculenta* [J]. Mol Plant Breed, 20(3): 733-741. [朱柏光，李闯，张雪娇，等，2022. 木薯 *MeSWEET*3*b* 的基因克隆及功能分析[J]. 分子植物育种，20(3)：733-741.]